

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001687

DEPDC1 稳定沉默 CNE-1 细胞株的构建与分析

封雪飞¹, 朱玲¹, 卜友泉², 张春冬², 朱江¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的: 为了进一步探讨 DEPDC1 (DEP domain containing 1) 在肿瘤发生发展中的作用。DEPDC1 是近年发现的一个肿瘤相关基因, 前期研究结果显示其在鼻咽癌细胞周期及癌变过程中具有作用。**方法:** 利用 qRT-PCR 和免疫组织化学染色分别检测 DEPDC1 在 18 例新鲜样品和 44 例组织芯片肿瘤患者中的表达情况。人鼻咽癌细胞系 CNE-1 稳定沉默 DEPDC1 后, 流式细胞检测细胞增殖并利用 Transwell 小室分析侵袭迁移情况。**结果:** DEPDC1 在鼻咽癌组织中表达量 (0.699 ± 0.521) 明显高于正常组织 (0.408 ± 0.183), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。DEPDC1 稳定沉默后, CCK8 检测结果表明 CNE-1 细胞增殖速度减慢。流式细胞检测的结果显示, G1 期细胞减少, G2/M 期细胞增多, 细胞周期进程受阻。划痕及 Transwell 实验结果表明, DEPDC1 稳定沉默明显减弱了 CNE-1 细胞运动, 侵袭及迁移能力 (77.033 ± 5.183 vs. 20.137 ± 2.828 , 107.336 ± 5.033 vs. 26.326 ± 1.414), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步定量 qRT-PCR 及 Western blot 检测发现, DEPDC1 稳定沉默导致上皮细胞标志分子 E-cadherin (0.457 ± 0.022) 显著上调、间质细胞标志分子 Vimentin (0.780 ± 0.063)、N-cadherin (0.780 ± 0.063) 以及 EMT 上游关键转录因子 Twist1 (0.710 ± 0.034) 下调 ($P < 0.05$)。**结论:** 本研究成功构建了 DEPDC1 稳定沉默细胞株, 与前期 siRNA 介导的瞬时沉默相似的是, 发现 DEPDC1 稳定沉默可抑制鼻咽癌细胞的增殖、侵袭迁移, 并改变 EMT 关键分子的表达, 为进一步探索 DEPDC1 在鼻咽癌中的作用机制奠定了基础。

【关键词】 鼻咽癌; DEPDC1; 细胞增殖; 细胞周期; 侵袭迁移**【中图分类号】** R734.2**【文献标志码】** A**【收稿日期】** 2016-12-27

Establishment and analysis of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1 with DEPDC1 stable silencing

Feng Xuefei¹, Zhu Ling¹, Bu Youquan², Zhang Chundong², Zhu Jiang¹

(1. Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of DEP domain containing 1 (DEPDC1) in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. **Methods:** The expression level of DEPDC1 in archival tissue samples from nasopharyngeal carcinoma patients and healthy individuals was examined by quantitative RT-PCR and immunohistochemical assay. The nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 with stable suppression of DEPDC1 expression was established by short hairpin RNA, and their proliferative capability and cell cycle status were separately assessed by CCK-8 assay and FACS assay. Additionally, their migratory and invasive abilities were detected using wound healing assay, Transwell migration and invasion assays. **Results:** The expression level of DEPDC1 in the tumor tissues (0.699 ± 0.521) was significantly higher than that in the normal tissues (0.408 ± 0.183) ($P < 0.05$). Suppression of DEPDC1 in CNE-1 cells revealed significant inhibition of cellular proliferation as well as G2/M phase arrest. Depletion of DEPDC1 also remarkably attenuated cell motility and invasiveness accompanied by the reduction of Twist1 (0.710 ± 0.034) and Vimentin (0.780 ± 0.063) ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our findings uncover a novel role for DEPDC1 in cell cycle progression and metastasis of nasopharyngeal carcinoma, and provide a rationale for its potential in the diagnosis and/or therapy of nasopharyngeal carcinoma.

作者介绍: 封雪飞, Email: 923572870@qq.com,

研究方向: 肿瘤发生。

通信作者: 朱江, Email: 13668052903@163.com。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81501979); 重庆市

渝中区科技计划资助项目 (编号: No. 20150110)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180514.0934.011.html>

(2018-05-14)

【Key words】 nasopharyngeal carcinoma; DEP domain containing 1; cell proliferation; cell cycle; migration and invasion

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)发病率占全球所有癌症的 0.6%,具有明显的地域和种族差异^[1],在我国南方、东南亚、中东以及北非较为常见^[2]。NPC 的发生源于鼻咽黏膜上皮,具有易转移、易复发的特点^[3]。尽管放化疗已经明显改善了 NPC 患者的 5 年生存率,但是 NPC 总体生存率依然较低^[4]。因此,研究 NPC 发病机制,探索 NPC 细胞转移过程的分子机制,对改善 NPC 治疗、提高患者生存率极其重要。

人源 DEPDC1 (DEP domain containing 1)是一个新发现的癌基因,从线虫到哺乳动物中均高度保守。首先发现其在膀胱癌中高表达并调节膀胱癌细胞的增殖生长^[5-7]。随后,研究证实 DEPDC1 在乳腺癌、肝癌、多发性骨髓瘤、宫颈癌等多种恶性肿瘤的发生过程具有重要作用^[8-9],并且影响肝癌、多发性骨髓瘤以及肺癌患者预后^[9,11]。敲减 DEPDC1 表达抑制膀胱癌细胞、骨髓瘤细胞以及 HeLa 细胞的生长并诱发细胞凋亡^[5,9,12]。这些研究结果显示 DEPDC1 肿瘤发生过程中起着重要作用,可作为多种恶性肿瘤的诊断或治疗的一个新的潜在靶点。但其在 NPC 中的作用及分子机制仍然未知。本研究拟对 DEPDC1 在 NPC 组织中 mRNA 及蛋白水平的表达进行分析,并构建 DEPDC1 稳定沉默的 CNE-1 NPC 细胞株,检测 CNE-1 细胞生长、细胞周期及运动,侵袭迁移能力的变化。探索癌基因 DEPDC1 在 NPC 发生发展中的作用机制,为进一步阐明 NPC 发生发展机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 组织与材料

33 例 NPC 冰冻组织(2013 年 4 月至 2015 年 12 月)与 18 例正常鼻咽部组织来自重庆医科大学附属第一医院病理科。患者的临床资料来自临床病例,无一患者在活检前接受过放疗。该研究方案已由重庆医科大学附属第一医院和国家卫生研究院的机构审查委员会审查和批准。人低分化 NPC CNE-1 细胞购于中南大学高等研究中心实验室。RPMI1640 培养基、青霉素-链霉素溶液以及胎牛血清均购于 Invitrogen 公司。总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Kit I 购于 Omega Bio-Tek 公司。反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR PremixEx TaqTM 由 TaKaRa 公司提供。细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、SDS 样本缓冲液等均购于 Beyotime 公司。化学发光试剂盒购于 Bio-Rad 公司。免疫组化试剂盒购于中杉金桥公司。DAB 显色试剂盒与苏木素-伊红染色液购于

Auragene。DEPDC1 抗体购于 Thermo Fisher 公司(PA5-34864)。E-cadherin 抗体(TA800692)、N-cadherin 抗体(TA503933)购于 OriGen 公司。Twist1 抗体购于 Abcam 公司(ab175430)。Vimentin 抗体购于 CST 公司(D21H3 #5741)。细胞增殖检测试剂盒 Cell Counting Kit-8 购于同仁化学公司。Transwell 小室购于 Millipore 公司。

1.2 组织芯片和免疫组化

用于检测 DEPDC1 表达的 NPC 组织芯片(TC0075)购于湖南艾佳生物(Auragene),NPC 组织芯片共 100 个样本,其中包含鼻咽部鳞状细胞癌组织 30 例,基底细胞癌组织 6 例,腺囊癌组织 2 例,腺癌组织 2 例,未分化癌组织 4 例,以及非癌症组织 56 例。免疫组织芯片经常规脱蜡,不同浓度乙醇水化,3% H₂O₂ 溶液封闭 15 min 阻断内源性过氧化物酶的活性,然后进行抗原修复。山羊血清封闭 60 min 后,DEPDC1 兔多克隆抗体孵育 4 ℃过夜。次日 DAB 显色,苏木素复染,脱水透明封片后镜下观察。通过染色强度和染色面积对 DEPDC1 表达进行评分。强度得分为:阴性=0 分,弱=1 分,中等=2 分,强=3 分,染色面积得分为:0%=0 分,1%~25%=1 分,26%~50%=2 分,51%~75%=3 分,76%~100%=4 分。综合染色强度和染色面积得分总和确定最终得分(0~7 分)。对于 DEPDC1 的表达分析,最终得分<3 分认为低表达;反之,得分≥3 分为高表达。

1.3 细胞培养

人 NPC 细胞 CNE-1 于用含有 10%胎牛血清(FBS)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的 RPMI1640 培养基,孵育于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱。

1.4 构建 LV-shRNA-DEPDC1 稳定沉默 CNE-1 多克隆细胞株

设计合成 DEPDC1 的寡核苷酸序列 DEPDC1 正义链-GATCCGGAAGATTGTTGAAGAAGTTCAAGAGAACTTCTTC AACATCTTCCTTTTGG;反义链-AATTCCAAAAAAGGAA-GATGTTGAAGAAGTTCTTGAAGAACTTCTTCAACATCTTCC-CG,克隆至带有绿色荧光蛋白(GFP)和嘌呤霉素抗性筛选标记的慢病毒表达载体 LV-shRNA,经测序验证命名为 LV-shRNA-DEPDC1。对照载体(LV-shRNA 空载, LV-sh-NC)和重组慢病毒载体(LV-sh-DEPDC1)病毒包装参见上海吉凯基因技术有限公司说明书。取 2×10⁵ 个对数生长期 CNE-1 细胞均匀铺入 6 孔板中,24 h 后细胞融合度达 50%。此时将 LV-sh-DEPDC1 及 LV-sh-NC 包装病毒感染 CNE-1 细胞,同时加入 5 μg/mL 的聚凝胺增加感染效率。12 h 后将含病毒的培养基更换为含 10%胎牛血清的 RPMI1640 新鲜培养基。倒置显微镜下观察感染 LV-sh-DEPDC1 和 LV-sh-NC 组细胞的感染效率。感染 72 h 后胰酶消化细胞,传入 6 cm 培养皿,加入含嘌呤霉素浓度为 1.5 μg/mL(最适浓度)的正常培养基继续培养筛选稳定转染细胞多克隆,并维持 2 周,待细胞不再死去,状态良好且融合度达 80%时,传入 10 cm 盘。收集细胞提取 RNA 及总蛋白检测 DEPDC1 沉默效率。剩余细胞继续培养,用于后续实验。

1.5 qRT-PCR 检测 DEPDC1 及相关 EMT 蛋白 mRNA 表达

1.5.1 引物设计合成 GAPAH、DEPDC1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 引物均由上海生工生物工程公司合成。GAPDH: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3', R5'-TCC-ACCACCCTGTTGCTGTA-3'; DEPDC1: 5'-GGTGTGCCATC-CCTAGAAGA-3', R5'-CATTGCTTCTTGGCCAATTT-3' (可扩增 DEPDC1 的两个剪接体); E-cadherin: 5'-TGAAGGTGACAGAGCCTCTGGAT-3', R5'-TGGGTGAATTCGGGCTT-GTT-3'; N-cadherin: 5'-ATCAACCCCATACACCAGCC-3', R5'-ACTAACCCGTCGTTGCTGTT-3'; Vimentin: 5'-CCAAA-CTTTCTCCTCCCTGAACC-3', R5'-GTGATGCTGAGAAGTTT-CGTTGA-3'; Twist1: 5'-GCCTTCTCGGTCTGGAGGAT-3', R5'-TTTCTCCTTCTCTGGAACAATGAC-3'。

1.5.2 总 RNA 的提取及 qRT-PCR 总 RNA 提取参照 Omega Bio-Tek RNA 提取试剂盒说明书。NPC 组织和正常鼻咽部组织, 慢病毒感染对照组 LV-sh-NC 和实验组 LV-sh-DEPDC1 细胞分别提取总 RNA, 测定 RNA 浓度。0.5 μ g 的总 RNA 采用 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit 进行反转录。qRT-PCR 以 GAPDH 为内参对照, 分别检测 DEPDC1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 的相对表达。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析定量 PCR 的结果^[13]。

1.6 免疫印迹检测 DEPDC1 及相关 EMT Marker 蛋白表达

取相同数目的慢病毒对照组 LV-sh-NC 和实验组 LV-sh-DEPDC1 细胞加入细胞裂解液 RIPA; 蛋白酶抑制剂 PMSF 为 100:1 配制, 超声 5 次, 每次 3 min, 置于冰上 30 min, 然后 12 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清液为蛋白样本, 采用 BCA 蛋白浓度测定法测定总蛋白浓度。分别采用 8%、12% 的 SDS-PAGE 分离胶分离样品, 220 mA 恒流湿转, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜。二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜。使用 Bio-Rad 公司化学发光试剂盒显影。所用一抗稀释比例 GAPDH (1:2 000)、DEPDC1 (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、N-cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:1 000)、Twist1 (1:1 000), 兔二抗和鼠二抗均为 (1:5 000)。

1.7 CCK8 检测稳定沉默 DEPDC1 后 CNE-1 的增殖能力

取慢病毒对照组 LV-sh-NC 和实验组 LV-sh-DEPDC1 细胞, 按 1 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 另设 3 个空白孔, 每孔加入 100 μ L RPMI1640 培养基, 细胞贴壁后于 0、24、48、72 h 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 细胞培养箱孵育 1 h, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值, 取 3 个复孔的平均值, 绘制生长曲线。

1.8 流式细胞术检测稳定沉默 DEPDC1 后 CNE-1 的周期

对数生长期慢病毒对照组 LV-sh-NC 和实验组 LV-sh-DEPDC1 细胞消化铺板后 24 h 后收集细胞, -20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 过夜固定。经 PI 染色后进行流式细胞分析。

1.9 划痕实验检测稳定沉默 DEPDC1 后 CNE-1 的侧向运动能力

用 Marker 笔在 6 孔板底部垂直划一条红线, 将实验组 LV-sh-DEPDC1 和对照组 LV-sh-NC 细胞接种于 6 孔板 (5×10^5 个/孔), 次日细胞融合度达 100%, 用 100 μ L 枪头垂

直于红线均匀划痕。PBS 清洗 2 次, 加入含 2% FBS 的 RPMI1640 培养基, 倒置显微镜下拍照, 此时记录为 0 h。然后于 24、48 h 在相同位置拍照记录。

1.10 侵袭迁移实验检测沉默 DEPDC1 后 CNE-1 的侵袭迁移能力

1.10.1 侵袭实验 用无血清的 RPMI1640 培养基以 7:1 的比例稀释 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 BD 基底膜基质胶 (Matrigel), 取 50 μ L 均匀铺入 Transwell 小室, 小心放入培养箱过夜。次日取出小室, 在 24 孔板中加入 500 μ L 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 将小室轻轻置于 24 孔板中, 向小室中加入 100 μ L 无血清的 RPMI1640 培养基的细胞悬液 (内含 8000 个 CNE-1 细胞), 置于细胞培养箱中培养 24 h。次日取出小室, PBS 清洗 2 遍, 加入甲醇固定 30 min, 5% 的结晶紫染色 10 min, PBS 冲洗小室, 棉签轻轻擦掉小室上层未侵袭的细胞, 自然风干后在光镜下随机取 5 个视野计数侵袭的细胞数。

1.10.2 迁移实验 细胞迁移实验与侵袭的操作过程完全相同, 不同之处在于迁移实验小室上室未铺 Matrigel。

1.11 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 DEPDC1 在 NPC 组织中高表达

前期研究发现 DEPDC1 在 2 株 NPC 细胞 CNE-1 和 HNE-1 中高表达^[14-15]。为了检测 DEPDC1 在 NPC 组织和正常鼻咽组织中的表达情况, 对 33 例 NPC 组织以及 18 例正常鼻咽组织进行 qRT-PCR 分析。结果显示 DEPDC1 在 mRNA 水平上在 NPC 组织中的表达 (0.699 ± 0.521) 明显高于正常鼻咽组织 (0.408 ± 0.183), 差异有统计学意义 ($t=12.720$, $P=0.027$) (图 1A)。为了进一步探讨 DEPDC1 在 NPC 中的表达情况, 我们利用 NPC 组织芯片进行免疫组化染色后分析 DEPDC1 在蛋白水平的表达情况。结果显示与相邻的非肿瘤组织相比, DEPDC1 在 NPC 组织表达明显升高 (图 1B)。

2.2 稳定细胞株中 DEPDC1 的 mRNA 及蛋白表达水平分析

前期研究结果显示, NPC 细胞中使用 siRNA 介导 DEPDC1 沉默后抑制细胞增殖、细胞周期进程及侵袭转移能力^[14-15]。为了更进一步分析 DEPDC1 在 NPC 细胞中的作用, 我们构建 DEPDC1 稳定沉默的 CNE-1 细胞株。DEPDC1 稳定沉默 NPC CNE-1 细胞筛选完成后 (图 2A), 分别提取总 RNA 及蛋白质。运用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 DEPDC1 的表达水平。结果显示与对照组 LV-sh-NC (1.041 ± 0.081) 相比, 实验组 LV-sh-DEPDC1 中 DEPDC1 相对表达量 (0.268 ± 0.008) 明显降低, 抑制率达 75%, 差异有统计学意义 ($t=15.090$, $P=0.001$) (图 2B)。另外, Western blot 检测结果显示, LV-sh-DEPDC1 组中 DEPDC1-V1、DEPDC1-V2 两个剪接体的表达与对照组 LV-sh-NC 相比明显降低 (图 2B)。表明在 NPC CNE-1 细胞中 DEPDC1 实现了稳定沉默, 可以用于后续实验并进行分析。

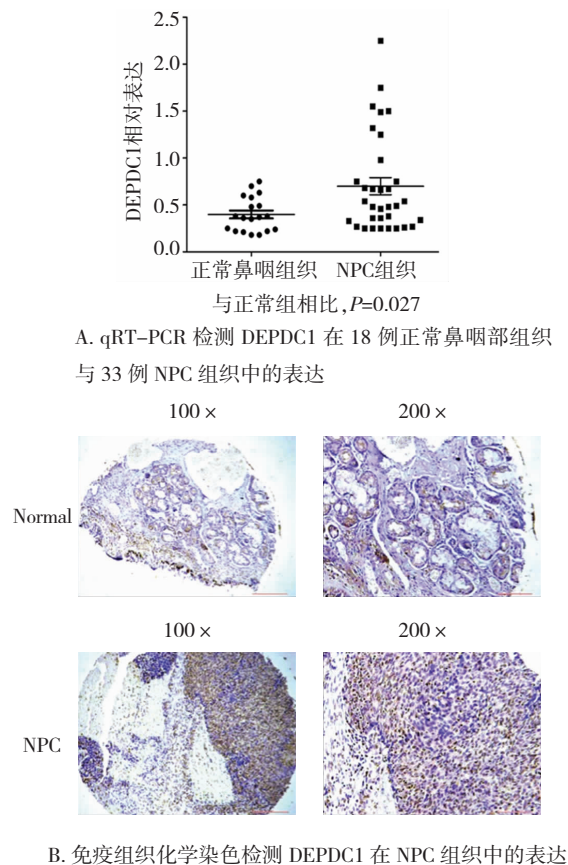


图 1 DEPDC1 过表达在 NPC 组织

Fig.1 DEPDC1 is overexpressed in NPC

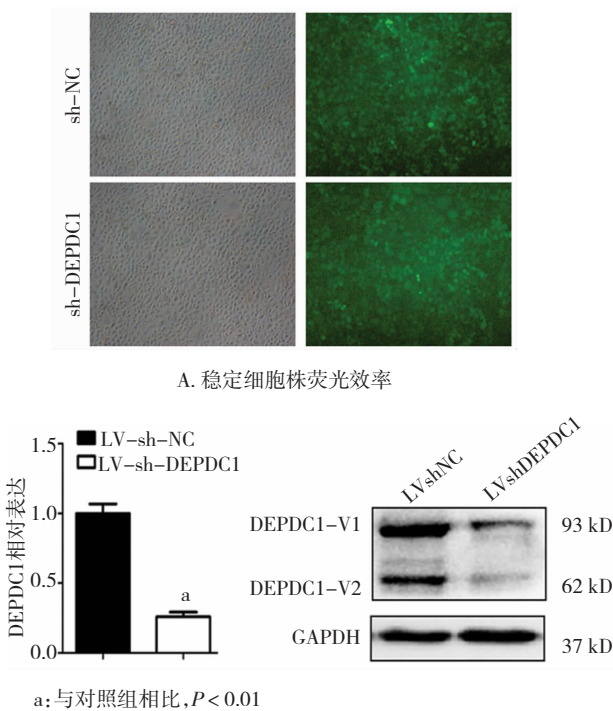
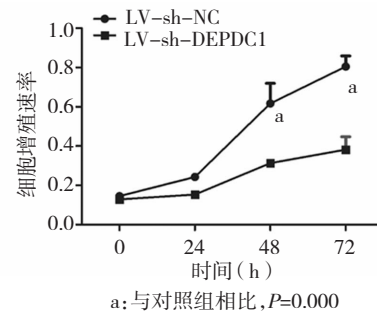


图 2 DEPDC1 稳定细胞株沉默效率检测

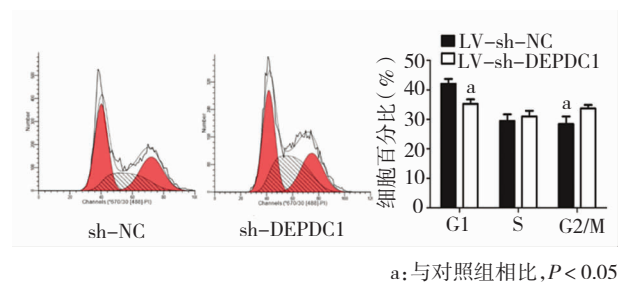
Fig.2 The efficiency analysis stable silencing of DEPDC1

2.3 DEPDC1 稳定沉默对 CNE-1 细胞增殖及细胞周期的影响

为了检测 DEPDC1 的稳定沉默对 NPC 细胞 CNE-1 增殖的影响。通过 CCK8 检测细胞增殖情况,结果显示相对于 LV-sh-NC 组, LV-sh-DEPDC1 组细胞在 24、48、72 h 增殖速度均明显降低 (0.262 ± 0.033 vs. 0.152 ± 0.003 , $t=13.490$, $P=0.023$; 0.600 ± 0.077 vs. 0.322 ± 0.019 , $t=24.300$, $P=0.004$; 0.798 ± 0.040 vs. 0.380 ± 0.046 , $t=8.651$, $P=0.000$) (图 3A), 表明 DEPDC1 稳定沉默后, CNE-1 细胞增殖能力受到明显抑制。随后, 通过流式细胞检查 DEPDC1 稳定沉默对 NPC 细胞 CNE-1 细胞周期的影响, 结果显示对照组细胞相比, DEPDC1 稳定沉默后 G₁ 期细胞减少 (43.083 ± 0.086 vs. 34.587 ± 0.421 , $t=10.670$, $P=0.000$), 而 S 期细胞无明显变化 (27.470 ± 0.764 vs. 30.683 ± 0.542 , $t=12.760$, $P=0.004$), 但 G₂/M 期细胞明显增多 (29.447 ± 0.789 vs. 34.730 ± 0.213 , $t=5.370$, $P=0.000$) (图 3B)。说明 DEPDC1 稳定沉默后, 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 从而影响正常的细胞周期进程, 导致细胞增殖受到抑制。



A. CCK8 检测增殖速率



B. 流式细胞检测细胞周期

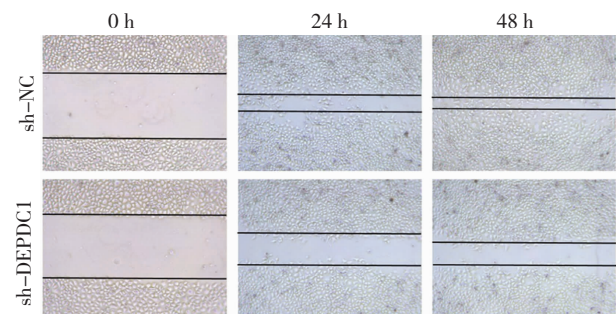
图 3 DEPDC1 稳定沉默抑制细胞增殖并导致细胞周期阻滞

Fig.3 Effects of stable silencing of DEPDC1 on proliferation and cell cycle in CNE-1

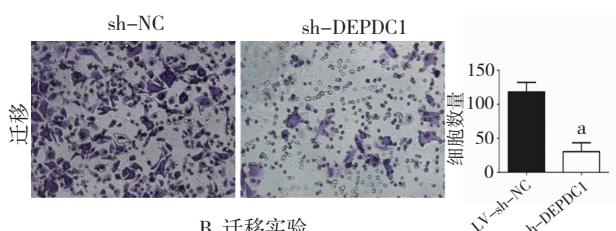
2.4 DEPDC1 稳定沉默对 CNE-1 细胞侧向运动能力以及侵袭迁移能力的影响

前期 siRNA 介导 DEPDC1 瞬时沉默结果显示, NPC 细胞中敲减 DEPDC1 表达导致细胞侧向运动及侵袭与迁移能力减弱。为了探讨 CNE-1 细胞中 DEPDC1 稳定沉默后对细胞运动能力的影响, 本课题组利用稳定沉默细胞株进行划痕及 Transwell 迁移侵袭实验。划痕实验结果显示, 细胞铺板 24 h 和 48 h 后 LV-sh-DEPDC1 组细胞侧向运动能力较 LV-sh-NC 组明显减弱 (图 4A)。而 Transwell 实验结果表明,

无论是侵袭(77.033 ± 5.183 vs. 20.137 ± 2.828 , $t=70.520$, $P=0.010$)还是迁移(107.336 ± 5.033 vs. 26.326 ± 1.414 , $t=63.110$, $P=0.000$),与 LV-sh-NC 组细胞相比, LV-sh-DEPDC1 组中穿膜细胞数量明显减少(图 4B)。这些结果说明在 NPC 细胞 CNE-1 中稳定沉默 DEPDC1 同样抑制细胞的侵袭和迁移。

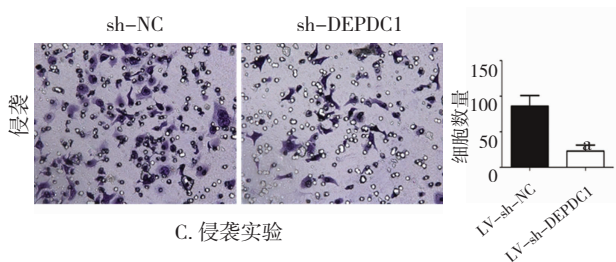


A. 划痕实验



B. 迁移实验

a: 与对照组相比, $P=0.000$



C. 侵袭实验

a: 与对照组相比, $P=0.000$

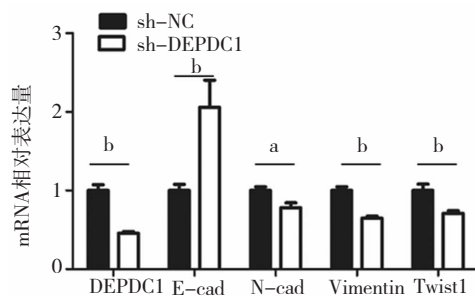
图 4 DEPDC1 稳定沉默抑制细胞的侵袭迁移能力

Fig.4 Stable silencing of DEPDC1 inhibits the metastasis and invasion of CNE-1

2.5 DEPDC1 稳定沉默对 EMT 相关基因的影响

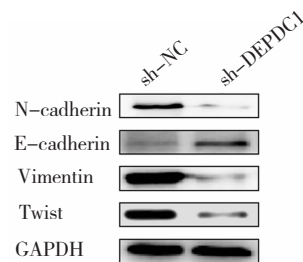
鉴于 DEPDC1 稳定沉默后抑制 NPC 细胞的侵袭及迁移能力,为了探讨 DEPDC1 调节 NPC 细胞侵袭及迁移的分子机制,我们进一步通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 DEPDC1 稳定沉默的 CNE-1 细胞株中 EMT 相关基因的表达情况。结果显示, DEPDC1 稳定敲降后导致上皮细胞标志基因 E-cadherin (0.457 ± 0.022 , $t=6.653$, $P=0.001$) 表达上调, 而间叶细胞标记基因 N-cadherin (0.780 ± 0.063 , $t=2.732$, $P=0.010$)、Vimentin (0.649 ± 0.026 , $t=4.260$, $P=0.000$) 及 EMT 上游关键转录因子 Twist1 (0.710 ± 0.034 , $t=3.636$, $P=0.004$) 表达均下调(图 5A、B)。这些研究结果表明 CNE-1 细胞中稳定 DEPDC1 沉默后, CNE-1 细胞的间叶表型减弱而上皮表型增强, 导致细胞运动能力减弱。表明在 NPC 组织中 DEPDC1 高

表达可能通过影响 EMT 相关基因的表达, 从而增强 CNE-1 细胞的侵袭迁移最终促进肿瘤发生发展。



a: 与对照组相比, $P < 0.01$; b: 与对照组相比, $P=0.000$

A. qRT-PCR 检测 EMT 途径相关基因表达



B. Western blot 检测 EMT 途径相关基因表达

图 5 DEPDC1 稳定沉默导致 EMT 关键分子表达变化

Fig.5 Stable silencing of DEPDC1 changes the expression of EMT-related molecules

3 讨论

NPC 与其他头颈部肿瘤不同, 由于其高度的侵袭性和转移性, 外科手术治疗仅仅用于抢救及清扫复发及残留的病灶^[16]。虽然放化疗的改进使 NPC 患者生存率大大提高, 仍有 4%~23% 的患者存在残留、复发以及转移^[19-20]。NPC 的发生发展是一个多步骤过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活等^[20-21]。因此, 就 NPC 发生发展的分子机制展开深入研究, 对于 NPC 的防治具有重要意义。

已有研究表明 DEPDC1 基因在多种恶性肿瘤(乳腺癌、膀胱癌、多发性骨髓瘤、肝癌、宫颈癌等)中呈现高表达, 并且在肿瘤发展进程中起重要作用, 且与预后呈负相关^[5, 9-10]。课题组前期研究发现, DEPDC1 在 2 个 NPC 细胞系 CNE-1 和 HNE-1 中高表达。并且在 NPC 细胞中利用 siRNA 介导 DEPDC1 表达沉默后, 导致 CNE-1 和 HNE-1 细胞周期阻滞在 G2/M 期, 细胞生长增殖减慢; 同时也抑制细胞的侵袭转移能力, 并且可能通过 A20/NF- κ B 通路诱导细胞的凋亡^[14-15]。

本研究 qRT-PCR 及 Western blot 结果显示, 鼻

咽癌组织中 DEPDC1 在 mRNA 及蛋白水平均高于非肿瘤组织。这与在乳腺癌、膀胱癌、多发性骨髓瘤、肝癌、宫颈癌等恶性肿瘤组织,以及 NPC 细胞系 CNE-1 和 HNE-1 细胞的检测结果类似,表明 DEPDC1 高表达可能同样对于促进 NPC 的发生发展具有重要作用。基于前期 2 个 NPC 细胞系 siRNA 处理后的检测结果,本实验利用慢病毒载体感染低分化 NPC 细胞系 CNE-1,构建了稳定沉默 DEPDC1 的 CNE-1 细胞株。检测发现 CNE-1 细胞稳定沉默 DEPDC1 后,导致生长增殖显著减慢。但细胞周期检测结果显示与瞬时敲减导致 G2/M 期阻滞不一样的是,稳定沉默 DEPDC1 导致细胞周期 S 期进程变缓,表明瞬时及稳定沉默 DEPDC1 表达可能通过不同机制诱发细胞增殖抑制,但其具体的分子机制仍有待于更深入的研究。而与瞬时沉默 DEPDC1 类似的是,稳定沉默也导致 NPC 细胞运动及侵袭迁移能力减弱,并且伴随着上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达上调,而间质细胞标志蛋白 N-cadherin 和 Vimentin 以及 EMT 关键上游转录因子 Twist1 表达下调。本研究推测,在 NPC 发生过程中,DEPDC1 的高表达可能促进细胞周期进程而增强细胞的增殖能力。同时由于其高表达可能导致 EMT 上游关键转录因子 Twist1 表达增高,而 Twist1 直接转录调控间质细胞 E-cadherin 和 Vimentin 等标志蛋白的表达,从而促进肿瘤侵袭转移过程。随着对 DEPDC1 研究的不断深入,这有助于揭示 NPC 发生发展分子机制,并为 NPC 的治疗提供新的靶点。

综上所述,通过对组织样品进行检查,证明 DEPDC1 在 NPC 患者组织中高表达。通过慢病毒载体感染低分化 NPC 细胞系 CNE-1,成功构建了 DEPDC1 稳定沉默细胞株,进一步证明 DEPDC1 稳定沉默对于 NPC 细胞的增殖及侵袭迁移具有重要作用,这为后续相关研究奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases [J]. Ann Glob Health, 2014, 80(5): 384-392.
- [3] Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Ann Oncol, 2010, 21(7): 308-312.
- [4] Lin JC, Jan JS, Hsu CY, et al. Phase III study of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for advanced nasopharyngeal carcinoma: positive effect on overall and progression-free survival [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(4): 631-637.
- [5] Kanehira M, Harada Y, Takata R, et al. Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis [J]. Oncogene, 2007, 26(44): 6448-6455.
- [6] Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, et al. Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells [J]. Cancer Res, 2010, 70(14): 5829-5839.
- [7] Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, et al. Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(7): 591-600.
- [8] Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, et al. Identification of early molecular markers for breast cancer [J]. Mol Cancer, 2011, 10(1): 15.
- [9] Kassambara A, Schoenhals M, Moreaux J, et al. Inhibition of DEPDC1A, a bad prognostic marker in multiple myeloma, delays growth and induces mature plasma cell markers in malignant plasma cells [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62752.
- [10] Okayama H, Kohno T, Ishii Y, et al. Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas [J]. Cancer Res, 2012, 72(1): 100-111.
- [11] Yuan SG, Liao WJ, Yang JJ, et al. DEP domain containing 1 is a novel diagnostic marker and prognostic predictor for hepatocellular carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(24): 10917-10922.
- [12] Mi Y, Zhang C, Bu Y, et al. DEPDC1 is a novel cell cycle related gene that regulates mitotic progression [J]. BMB Rep, 2015, 48(7): 413-418.
- [13] Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, et al. NFB1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397(2): 157-162.
- [14] 何龙霞, 糜燕, 张春冬, 等. 沉默 DEPDC1 基因表达对鼻咽癌细胞系 HNE-1 生长和细胞周期的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(3): 349-355.
- [15] 李红霞, 封雪飞, 卜友泉, 等. 沉默 DEPDC1 抑制鼻咽癌细胞 HNE-1 和 CNE-1 侵袭迁移 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 665-671.
- [16] Vlantis AC, Chan HS, Tong MC, et al. Surgical salvage nasopharyngectomy for recurrent nasopharyngeal carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors [J]. Head Neck, 2011, 33(8): 1126-1131.
- [17] Na'ara S, Amit M, Billan S, et al. Outcome of patients undergoing salvage surgery for recurrent nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis [J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(9): 3056-3062.
- [18] Lee AW, Sze WM, Au JS, et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern era: the Hong Kong experience [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61(4): 1107-1116.
- [19] Wang J, Shi M, Hsia Y, et al. Failure patterns and survival in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with intensity modulated radiation in Northwest China: a pilot study [J]. Radiat Oncol, 2012, 7: 2.
- [20] Yang Y, Liao Q, Wei F, et al. LPLUNC1 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth via down-regulation of the MAP kinase and cyclin D1/E2F pathways [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62869.
- [21] Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, et al. Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor-deficient expression in human nasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Int J Cancer, 2008, 123(9): 2065-2072.

(责任编辑:张辉洁)